T-SPOT.TB 96

Aide au diagnostic de l'infection tuberculeuse

Format Plaque à 96 puits (TB.200)

NOTICE

Pour usage diagnostique *in vitro*

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

PI-TB96-IVD-FR-V8

T-SPOT.*TB 96*

Format Plaque à 96 puits (TB.200)

Table des matières	**Page**
Utilisation prévue	2
Introduction	2
Principes de la procédure	2
Limitations	3
Mises en garde sécuritaires et précautions	4
Matériel fourni	4
Conservation	4
Stabilité	4
Equipement et matériel nécessaires mais non fournis	4
Préparation du réactif	5
Méthode	5
Prélèvement et préparation des échantillons	5
Comptage des cellules et dilution	6
Préparation de la plaque et incubation	6
Développement et comptage des spots	7
Contrôle de la qualité	8
Interprétation des résultats et Critères du test	8
Caractéristiques de performance du test	9
Références	9
Glossaire des symboles	10

Utilisation prévue
T-SPOT®.*TB* est un test de diagnostic *in vitro* de détection des cellules T effectrices qui répondent à une activation par les antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* ; il est destiné à être utilisé comme aide au diagnostic de l'infection tuberculeuse. T-SPOT.*TB* est une procédure ELISPOT simplifiée qui comptabilise les cellules T effectrices individuelles activées par des antigènes spécifiques de la tuberculose.

Introduction
La réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis* est principalement une réponse immunitaire à médiation cellulaire (CMI). Dans le cadre de cette réponse, les cellules T sont sensibilisées aux antigènes de *M. tuberculosis*. Les cellules T effectrices activées, CD4 et CD8, spécifiquement séparées du sang, peuvent être quantifiées du fait de leur capacité à être stimulées *in vitro* par ces antigènes[1,2]. L'utilisation d'antigènes sélectionnés pour le complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum*) améliore la spécificité en diminuant la réactivité croisée au BCG et à de nombreuses mycobactéries environnementales[3,4]. Deux panels d'antigènes distincts, qui simulent les protéines ESAT-6 et CFP10 bien caractérisées, sont utilisés pour optimiser la sensibilité du test.

T-SPOT.*TB* est une version simplifiée de la technique ELISPOT (enzyme-linked immunospot). Les tests ELISPOT sont d'une sensibilité exceptionnelle dans la mesure où la cytokine cible est capturée directement autour de la cellule sécrétrice, avant qu'elle ne soit diluée dans le surnageant, capturée par les récepteurs de cellules adjacentes ou encore dégradées. Ceci rend les tests ELISPOT beaucoup plus sensibles que les mesures ELISA conventionnelles[5]. T-SPOT.*TB* est conçu pour détecter les cellules T effectrices qui répondent à une activation par des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*[3,4,6-9]. T-SPOT.*TB* quantifie individuellement les cellules T activées par des antigènes spécifiques de la tuberculose. Le test est adapté pour tous les patients à risque d'infection tuberculeuse latente (LTBI) ou suspectés de tuberculose[10,11], quel que soit leur âge, leur sexe, leur groupe ethnique, leur thérapie ou leur statut immunologique.

Principes de la procédure
Les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) sont séparées de l'échantillon de sang total et lavées pour éliminer toutes les sources de bruit de fond. Les PBMC sont ensuite comptées pour s'assurer qu'un nombre standardisé de cellules est ajouté pour la détection. Ceci permet de garantir qu'un nombre adéquat de cellules est introduit dans les puits de microtitration et cela même chez ceux dont les titres de cellules T sont faibles en raison de l'affaiblissement de leur système immunitaire (individus immunocompromis ou immunosupprimés) . Les étapes de lavage et de comptage ainsi que la technique d'ELISPOT permettent d'obtenir des résultats supérieurs dans la détection de la tuberculose ou d'infection tuberculeuse latente.

Quatre puits (voir Figure 1) sont nécessaires pour chaque prélèvement :-

1. Un Contrôle Négatif pour identifier l'activation cellulaire non-spécifique
2. Des antigènes spécifiques de la TB, Panel A (ESAT-6).
3. Des antigènes spécifiques de la TB, Panel B (CFP10).
4. Un Contrôle Positif à la phytohémagglutinine (PHA, un activateur polyclonal connu[12]) comme test de la fonctionnalité des PBMC.

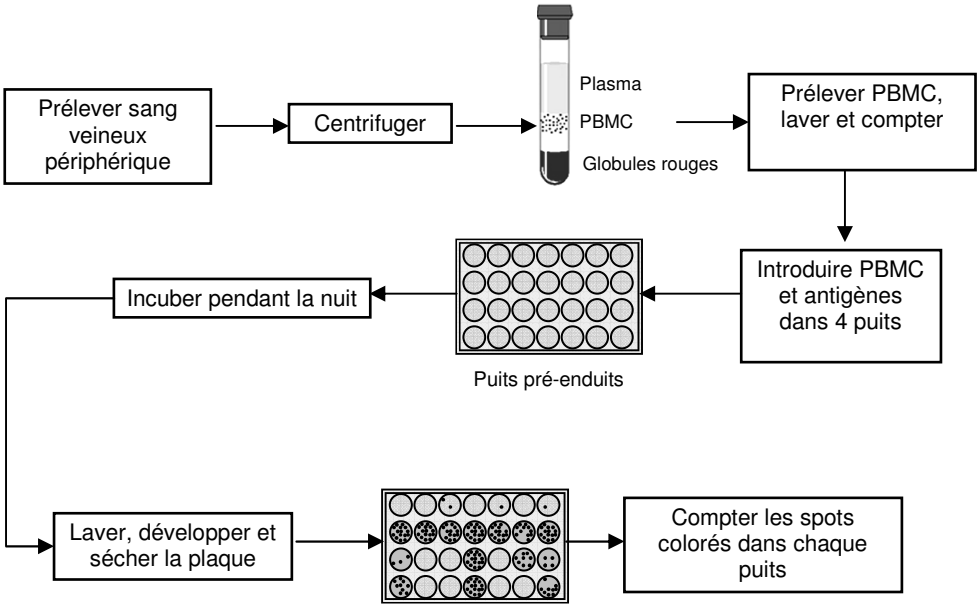


Figure 1 : Diagramme illustrant les principales étapes de T-SPOT.TB

Les PBMC sont incubées avec les antigènes pour permettre la stimulation des cellules T sensibilisées éventuellement présentes. La cytokine produite est capturée par les anticorps spécifiques à la surface de la membrane, qui forme la base du puits, et les cellules et autres matériels indésirables sont éliminés par lavage. Un second anticorps, conjugué à la phosphatase alcaline et dirigé sur un différent épitope de la cytokine, est ajouté et se fixe sur la cytokine capturée à la surface de la membrane. Tout conjugué non fixé est éliminé par lavage. Un substrat soluble est ajouté dans chaque puits ; il est clivé par l'enzyme qui lui est liée et forme ainsi un spot de précipité insoluble au site de la réaction. Chaque spot représente l'empreinte d'une cellule T individuelle sécrétrice de cytokines et le comptage des spots obtenus donne une mesure de la quantité de cellules T effectrices sensibles à *M. tuberculosis* dans le sang périphérique.

Limitations

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- Emploi professionnel uniquement.
- Conserver le kit non ouvert à une température de 2 à 8°C. Le kit ne doit pas être utilisé après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Ne pas mélanger les composants de kits de lots différents.
- T-SPOT.*TB 96* est conçu pour un usage unique.
- Lire attentivement la notice d'utilisation avant l'emploi.
- Travailler de manière aseptique afin d'éviter de contaminer les réactifs, les puits, les suspensions cellulaires et les milieux de culture cellulaire.
- Tout écart par rapport aux techniques de pipetage et de lavage et aux temps et/ou températures d'incubation indiqués peut influencer les résultats obtenus et doit être évité.
- Le sang prélevé pour le test doit être utilisé dans les 8 heures.
- Les prélèvements de sang doivent être conservés et transportés vers le laboratoire à température ambiante (18 à 25°C). Ne pas réfrigérer ou congeler les échantillons de sang total.
- T-SPOT.*TB* doit être utilisé et interprété uniquement dans le contexte du tableau clinique global.
- Un résultat négatif du test n'exclut pas la possibilité d'une exposition à ou d'une infection par *M. tuberculosis.*
- Les antigènes ESAT-6 et CFP10 sont absents dans les souches BCG et dans la plupart des mycobactéries environnementales, excepté *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*[3,4] et *M. gordonae*.

Mises en garde sécuritaires et précautions
Des précautions doivent être prises lors de la manipulation de produits d'origine humaine. Tous les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

La manipulation des échantillons de sang et des composants de l'essai ainsi que leur utilisation, conservation et élimination doivent se faire conformément aux procédures stipulées dans les directives ou règlements nationaux appropriés sur la protection contre les biorisques.

Des précautions doivent être prises lors du travail avec des produits chimiques. Tous les produits chimiques doivent être considérés comme potentiellement dangereux.

Matériel fourni
T-SPOT.*TB 96* contient :

1. 1 plaque de microtitration : 96 puits enduits d'un anticorps monoclonal murin anti-cytokine interféron gamma (IFN-γ).
2. 2 flacons (0,7 ml chacun) – Panel A : contenant antigènes ESAT-6*,* albumine bovine et agents antimicrobiens.
3. 2 flacons (0,7 ml chacun) – Panel B : contenant antigènes CFP10, albumine bovine et agents antimicrobiens.
4. 2 flacons (0,7 ml chacun) – Contrôle Positif : contenant la phytohémagglutinine (PHA), utilisée comme contrôle de la fonctionnalité des cellules, albumine bovine et agents antimicrobiens.
5. 1 flacon (50 µl) de réactif conjugué concentré 200 x : anticorps monoclonal murin anti-cytokine IFN-γ conjugué à la phosphatase alcaline.
6. 1 flacon (25 ml) de solution de substrat : solution BCIP/NBT^{plus} prête à l'emploi.
7. Mode d'emploi que l'on retrouve sur le CD avec la fiche signalétique des données de sécurité, le Manuel technique, le Guide de la Méthode visuel et le T-SPOT.*Reporter*.

Conservation
Conserver tous les composants du kit à une température située entre 2 et 8°C.
Eviter l'exposition prolongée de la solution de substrat à la lumière.

Stabilité
Les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage du kit, s'ils sont conservés et manipulés dans les conditions recommandées.

Equipement et matériel nécessaires mais non fournis
1. Hotte microbiologique de classe II (recommandé).
2. Tubes de prélèvement sanguin tels que Vacutainer® CPT™ ou tubes héparinés.
3. Ficoll ou autre milieu de séparation des PBMC.
4. Centrifugeuse pour la préparation des PBMC (capable d'au moins 1800 x g et de maintenir les échantillons à température ambiante (18 à 25°C)).
5. Equipement et réactifs permettant de compter les PBMC ; soit manuellement avec du bleu trypan et un hémocytomètre au microscope soit automatiquement à l'aide d'un analyseur hématologique.
6. Incubateur humidifié à 5 % de CO_2 - 37 ± 1°C.
7. Laveur de plaques de microtitration ou matériel pour le lavage manuel des plaques.
8. Pipettes et embouts de pipette stériles.
9. PBS stérile tel que GIBCO™ 1 x D-PBS (Invitrogen ; numéro de catalogue 14040-091).
10. Eau distillée ou eau déionisée.
11. Un moyen de lecture des plaques tel qu'un microscope, une loupe ou un lecteur de plaque.
12. Milieu de culture cellulaire stérile tel que GIBCO AIM-V™ (Invitrogen ; numéro de catalogue 31035-025) : l'utilisation de ce milieu sans sérum dans l'étape d'incubation est fortement recommandée. Le milieu RPMI 1640 (Invitrogen ; numéro de catalogue 21875-034) ne peut être utilisé que pour les étapes initiales de préparation des échantillons. Il est recommandé

de conserver le milieu de culture cellulaire dans des aliquotes appropriées et d'éliminer le matériel excédentaire après emploi. Le milieu de culture cellulaire doit être réchauffé à 37°C avant de l'utiliser avec T-SPOT.*TB.*

Préparation du réactif

1. Plaque de microtitration. La plaque de microtitration T-SPOT.*TB 96* est fournie prête à l'emploi. La sortir du lieu de conservation et la laisser se stabiliser à température ambiante. Enlever l'emballage extérieur en aluminium et éliminer le sachet de déshydratant.
2. Les flacons d'antigènes ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Panel A) sont fournis prêts à l'emploi.
3. Les flacons d'antigènes CFP10 de *M. tuberculosis* (Panel B) sont fournis prêts à l'emploi.
4. Les flacons de Contrôle Positif sont fournis prêts à l'emploi.
5. Préparer une solution de travail de conjugué dilué à 1:200. Calculer le volume de la solution de travail de conjugué nécessaire et la préparer juste avant l'emploi.
6. La solution de substrat est fournie prête à l'emploi. La sortir de son lieu de conservation et la laisser se stabiliser à température ambiante.

Méthode

Cet essai doit être réalisé selon les principes des Bonnes Pratiques de Laboratoire et en adhérant rigoureusement à ce mode d'emploi.

Oxford Immunotec Ltd a préparé un ensemble de documents techniques décrivant certaines options évaluées dans nos laboratoires concernant le prélèvement et la préparation des échantillons, le choix du milieu de culture des cellules et les méthodes de comptage des spots. En plus des Points Clés et Notes de la présente notice, un Guide de la Méthode visuel et un Manuel technique sont également disponibles. Tous ces documents techniques peuvent être obtenus en appelant le +44 (0) 1235 442780 ou téléchargés à partir de www.oxfordimmunotec.com.

Prélèvement et préparation des échantillons

Les utilisateurs doivent valider leurs propres procédures de recueil des PBMC, d'énumération des PBMC et de choix du milieu adapté pour supporter la fonctionnalité des cellules T au cours de l'étape d'incubation primaire du test. Normalement, chez un sujet immunocompétent, il est possible d'obtenir suffisamment de PBMC provenant de prélèvements de sang veineux pour réaliser l'essai selon les directives suivantes :

- Adultes et enfants de plus de 10 ans : un tube de 8 ml ou deux tubes de 4 ml
- Enfants de 2 à 9 ans : un tube de 4 ml
- Enfants de moins de 2 ans : un tube pédiatrique de 2 ml

Les échantillons de sang doivent être conservés à température ambiante et testés le jour du prélèvement. Le milieu de culture cellulaire doit être réchauffé à 37°C avant de l'utiliser avec T-SPOT.*TB.*

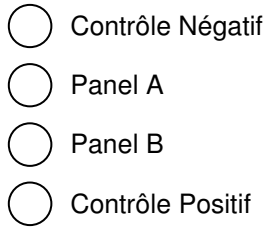
Méthode	**Notes**
1. Prélever un échantillon de sang selon le mode d'emploi fourni avec le dispositif de prélèvement. Conserver le sang prélevé à température ambiante (18 à 25°C). Ne pas réfrigérer ni congeler.	1. Les échantillons de sang peuvent être recueillis dans divers tubes. Dans nos laboratoires, nous avons utilisé avec succès des tubes Vacutainer CPT citrate de sodium, des tubes CPT héparine sodique et des tubes héparine de lithium standards. Les tubes EDTA ne sont pas recommandés.
2. Avec les tubes CPT de prélèvement de sang, suivre les consignes du fabricant pour la séparation des PBMC. Avec les autres méthodes de prélèvement de sang, préparer les PBMC par centrifugation sur Ficoll-Paque™ Plus en utilisant les procédures publiées.	2. Centrifuger un tube CPT de 8 ml à 1600 x g pendant 28 min ou un tube CPT de 4 ml à 1800 x g pendant 30 min à température ambiante (18 à 25°C). Ou bien, diluer le sang avec un volume égal de milieu RPMI 1640. Déposer soigneusement le sang dilué (2-3 volumes) sur Ficoll-Paque Plus (1 volume) et centrifuger à 1000 x g pendant

	22 min à température ambiante (18 à 25°C).
3. Recueillir la bande blanche et trouble de PBMC à l'aide d'une pipette et transférer dans un tube à centrifuger conique de 15 ml. Ajouter le milieu de culture cellulaire pour obtenir un volume de 10 ml.	3. Divers milieux peuvent être utilisés pour laver les cellules durant ce processus. Dans nos laboratoires, les milieux AIM-V et RPMI 1640 ont tous deux été utilisés avec succès et sont recommandés.
4. Centrifuger à 600 x g pendant 7 min. Vider le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de milieu.	4. Voir 3, ci-dessus.
5. Ajouter du milieu neuf pour obtenir un volume de 10 ml et centrifuger à 350 x g pendant 7 min.	5. Voir 3, ci-dessus.
6. Vider le surnageant et resuspendre le culot dans 0,7 ml de milieu.	6. A ce stade, le culot doit être resuspendu dans le milieu de culture sélectionné pour l'incubation de nuit. Dans nos laboratoires, le milieu sans sérum AIM-V a été utilisé avec succès et est fortement recommandé.

Comptage des cellules et dilution
T-SPOT.*TB* nécessite 2,5 x 10^5 PBMC viables par puits. Au total quatre puits sont requis pour chaque échantillon d'un patient. Le nombre de cellules introduites dans chaque puits doit être correct, faute de quoi l'interprétation du résultat risque d'être erronée.

Méthode	**Notes**
1. Effectuer le comptage des cellules viables.	1. Les cellules peuvent être comptées de plusieurs façons dont le comptage manuel en utilisant du bleu trypan et un hémocytomètre et le comptage automatique à l'aide d'un instrument approprié.
2. En bref, pour le comptage manuel au moyen d'un hémocytomètre Neubauer, introduire 10 µl de suspension cellulaire finale dans 40 µl de solution de bleu trypan à 0,4 % (p/v). Placer un volume approprié sur l'hémocytomètre et compter les cellules dans la grille. Pour les autres types d'hémocytomètre et pour les instruments automatiques, suivre les consignes du fabricant.	2. Faire attention et s'assurer que la suspension de cellules est bien mélangée juste avant le prélèvement en vue de la dilution ou du comptage car des cellules peuvent se déposer au fond du tube ce qui entraînerait une interprétation erronée du vrai nombre de cellules.
3. Calculer la concentration de cellules viables présentes dans la suspension de cellules mère.	3. S'assurer que le calcul est correct compte tenu du système de comptage utilisé, l'utilisation d'un nombre de cellules insuffisant ou excessif pouvant entraîner une interprétation erronée du résultat.
4. Préparer 500 µl de suspension de cellules finale à une concentration de 2,5 x 10^5 cellules/ 100 µl.	4. S'assurer que les cellules sont bien mélangées avant le prélèvement en vue de la dilution.

Préparation de la plaque et incubation
T-SPOT.*TB* nécessite quatre puits pour chaque échantillon d'un patient. Un Contrôle Négatif et un Contrôle Positif de la fonctionnalité des cellules doivent être effectués sur chaque échantillon individuel. Il est recommandé d'organiser les échantillons verticalement sur la plaque, comme illustré ci-dessous.



Méthode	Notes
1. Sortir la plaque de microtitration pré-enduite de son emballage et laisser stabiliser à température ambiante.	1. La plaque de microtitration fournie comporte une base de protection en plastique qui ne doit pas être enlevée, à aucune étape de la procédure.
2. Quatre puits sont nécessaires pour chaque échantillon d'un patient ; (i) Introduire 50 µl de milieu de culture cellulaire dans chaque puits de Contrôle Négatif. (ii) Introduire 50 µl de solution du Panel A dans chaque puits nécessaire. (iii) Introduire 50 µl de solution du Panel B dans chaque puits nécessaire. (iv) Introduire 50 µl de solution de Contrôle Positif dans chaque puits de contrôle de la fonctionnalité des cellules.	2. Ne pas toucher la membrane avec l'embout de la pipette. Les indentations dans la membrane causées par l'embout des pipettes peuvent causer des artefacts dans les puits. Il sera peut-être nécessaire de tapoter la plaque pour s'assurer que les solutions couvrent la membrane au fond de chaque puits. Eviter de l'agiter vigoureusement pour minimiser la possibilité de contamination croisée des antigènes entre les puits.
3. Dans chacun des 4 puits qui sera utilisé pour l'échantillon d'un patient, introduire 100 µl de suspension de cellules finale du patient (contenant 250 000 cellules viables).	3. Mélanger la suspension de cellules en pipetant soigneusement plusieurs fois avant de prélever chaque aliquote de 100 µl. Il est recommandé d'utiliser un nouvel embout pour chaque prélèvement de cellules T de chaque patient pour éviter la possibilité de contamination entre les 4 puits.
4. Incuber la plaque à 37°C dans un incubateur humidifié à 5 % de CO_2 pendant 16 à 20 heures.).	4. Eviter de remuer la plaque une fois qu'elle se trouve dans l'incubateur. Ne pas empiler les plaques car cela peut entraîner une répartition inégale de la température et de la ventilation. Le non respect du temps d'incubation recommandé peut entraîner une interprétation erronée du résultat.

Développement et comptage des spots

Pendant les étapes de lavage de la plaque et de développement, ne pas toucher la membrane avec l'embout des pipettes ou les canaux du laveur de puits automatisé. Les indentations de la membrane causées par l'embout des pipettes ou du laveur de puits peuvent se révéler comme des artefacts dans les puits, ce qui rendra le comptage des spots difficile.

Méthode	Notes
1. Sortir la plaque de l'incubateur et éliminer le milieu de culture des cellules.	1. A ce moment-là, sortir la solution de substrat du kit et laisser se stabiliser à température ambiante.
2. Introduire 200 µl de solution PBS dans chaque puits.	
3. Eliminer la solution PBS. Répéter le lavage du puits encore 3 fois avec de la solution fraîche pour chaque lavage.	3. Eliminer tout le PBS de la dernière étape de lavage en retournant doucement la plaque sur du papier absorbant avant de continuer.
4. Diluer le réactif conjugué concentré au 1/200ème avec le PBS pour obtenir la solution de travail.	4. Ne pas utiliser de PBS contenant du Tween™ ou d'autres détergents car cela entraîne un bruit de fond élevé. S'assurer de ne préparer qu'une petite quantité excédentaire de la solution de travail (pour permettre une perte). Ainsi, pour 96 puits nécessitant 50 µl chacun, préparer 5 ml de la solution de travail en ajoutant 25 µl de réactif conjugué concentré à 4975 µl de PBS.

5. Introduire 50 µl de solution de travail du réactif conjugué dans chaque puits et incuber à 2 à 8°C pendant 1 heure.	5. Le non respect du temps d'incubation recommandé peut entraîner une interprétation erronée du résultat.
6. Eliminer le conjugué et effectuer quatre lavages au PBS comme décrit aux étapes 2 et 3 ci-dessus.	
7. Introduire 50 µl de solution de substrat dans chaque puits et incuber à température ambiante pendant 7 min.	7. Le non respect du temps d'incubation recommandé peut entraîner une interprétation erronée du résultat.
8. Laver la plaque abondamment avec de l'eau distillée ou déionisée pour arrêter la réaction de détection.	
9. Laisser sécher la plaque en la mettant dans un endroit bien aéré ou dans un four à une température maximale de 37°C.	9. Les spots deviennent plus visibles avec le séchage de la plaque. Laisser sécher 4 heures à 37°C ou jusqu'au lendemain à température ambiante.
10. Compter et noter le nombre de spots bleu foncé distincts sur la membrane de chaque puits. Appliquer l'Interprétation des résultats et Critères du test (voir ci-dessous) pour déterminer si l'échantillon du patient est « Réactif » ou « Non Réactif » aux antigènes TB.	10. Les spots peuvent être visualisés de plusieurs façons à savoir une loupe à main, un microscope adéquat ou un lecteur de plaque ELISPOT dédié.

Contrôle de la qualité
Dans un résultat type, on s'attend à ce qu'il y ait peu ou pas de spots dans le Contrôle Négatif et plus de 20 spots dans le Contrôle Positif.

Le Contrôle Négatif sera considéré comme « Indéterminé » si le nombre de spots comptés est supérieur à 10. Les résultats d'un tel échantillon peuvent être difficiles à interpréter. Se référer au Manuel technique T-SPOT.*TB* pour les causes possibles (télécharger à partir de www.oxfordimmunotec.com). Il sera peut-être nécessaire de prélever un autre échantillon et de refaire le test.

Normalement, le nombre de spots pour le Contrôle Positif de la fonctionnalité des cellules devrait être ≥ 20 ou montrer une saturation (spots trop nombreux pour les compter). Il est possible que les cellules T d'une faible proportion de patients ne montre qu'une réaction limitée à la PHA[13,14]. Le Contrôle Positif sera considéré comme « Indéterminé » quand le nombre de spot est < 20 spots, à moins que le Panel A ou le Panel B ne soit « Réactif » tel que décrit dans l'Interprétation des résultats et Critères du test (voir ci-dessous), auquel cas, le résultat est valide.

En raison des variations biologiques et systématiques potentielles, lorsque le Contrôle Négatif comporte 0 à 5 spot(s) et (le nombre de spots au Panel A ou au Panel B) – (le nombre de spots dans le Contrôle Négatif) = 5 à 7, ceci peut être considéré comme une « zone grise » et doit être considéré conjointement à l'ensemble des informations cliniques disponibles. Il peut être jugé nécessaire de prélever un autre échantillon et de refaire le test pour l'individu concerné.

Bien que les antigènes ESAT-6 et CFP10 soient absents dans les souches BCG de *M. bovis* et dans la majorité des mycobactéries environnementales, il est possible qu'un résultat « Réactif » au T-SPOT.*TB* soit dû à une infection par *M. kansasii*, *M. szulgai, M. marinum* ou *M. gordonae.* D'autres tests seront requis si ces infections sont suspectées.

Interprétation des résultats et Critères du test
Veuillez vous référer à la section Contrôle de la Qualité avant d'appliquer les critères suivants.

Le résultat du test est « Réactif » si le Panel A ou le Panel B ou les deux Panels répondent, conformément aux critères suivants :

Lorsque le Contrôle Négatif présente 0 à 5 spot(s), et
(le nombre de spots au Panel A ou au Panel B) – (le nombre de spots dans le Contrôle Négatif) ≥ 6.

Lorsque le Contrôle Négatif présente 6 à 10 spots, et
(le nombre de spots au Panel A ou au Panel B) ≥ 2 x (le nombre de spots dans le Contrôle Négatif).

Le résultat du test est « Non réactif » si les critères ci-dessus sont respectés et le Contrôle Positif est valide.

Lorsque le Contrôle Positif est « Indéterminé » et que le Panel A et le Panel B sont tous deux « Non réactif » le test doit être considéré comme « Indéterminé » et doit être refait.

Un résultat « Réactif » indique que l'échantillon contient des cellules T effectrices réagissant à *M. tuberculosis.*

Un résultat « Non réactif » indique que l'échantillon ne contient probablement pas de cellules T effectrices réagissant à *M. tuberculosis*.

Caractéristiques de performance du test
La **spécificité** a été évaluée en testant 93 échantillons de donneurs qui, d'après leurs antécédents médicaux et les renseignements personnels, ont été jugés comme présentant un faible risque d'infection par *M. tuberculosis*. La spécificité de T-SPOT.*TB* a été calculée comme étant de 100 % (93/93) (niveau de confiance 95 % avec intervalles de confiance de 95,8 % à 100 %).

La **sensibilité** a été évaluée en testant 87 échantillons provenant de cas d'infection par *M. tuberculosis* confirmés par culture, comprenant des groupes immunodéprimés. La sensibilité de T-SPOT.*TB* a été calculée à 98,8 % (86/87) (niveau de confiance 95 % avec intervalles de confiance de 90,8 % à 99,9 %).

La **reproductibilité** a été évaluée, comme marqueur de substitution de la variation intra essai, par une analyse des échantillons sanguins effectuée en duplicat sur la même plaque. Au total, 145 échantillons sanguins provenant de 140 donneurs différents ont été testés en duplicat (deux puits pour le Panel A et deux puits pour le Panel B) en utilisant T-SPOT.*TB*. Une concordance clinique a été observée dans 142/145 (97,9 %) analyses des duplicats. Deux duplicats ont donné des résultats marginalement discordants et 1/145 échantillons a donné des résultats en désaccord.

La **répétabilité** a été évaluée, comme marqueur de substitution de la variation inter essai, par une analyse des échantillons sanguins effectuée en duplicat sur deux plaques différentes. En tout, 208 échantillons sanguins provenant de donneurs différents ont été testés en duplicat (deux puits pour le Panel A et 2 puits pour le Panel B avec un puits sur chacune des deux plaques) en utilisant T-SPOT.*TB*. Une concordance clinique a été observée dans 206/208 (99.0 %) analyses des duplicats.

Références
1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2nd Ed.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2nd Ed.
3. Chapman *et al* (2002) AIDS, **16** (17): 2285-2293.
4. Ewer *et al* (2003) Lancet, **361**: 1168-1173.
5. Voir www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
6. Pathan *et al* (2001) J. Immunol., **167**: 5217-5225.
7. Lalvani *et al* (2001) Lancet, **357**: 2017-2021.
8. Lalvani *et al* (2001) Am. J. Resp. Crit. Care Med., **163**: 824-828.
9. Lalvani *et al* (2001) J. Infect. Dis., **183**: 469-477.
10. Meier *et al* (2005) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **24**: 529-536.
11. Zellweger *et al* (2005) Int. J. Tuberculosis and Lung Dis., **9**(11): 1242-1247.

12. Directive approuvée par le NCCLS. *Performance of single Cell Immune Response Assays*, I/LA26-A
13. Koller *et al* (2003) Clin. Exp. Immunol., **132**(2): 225-231.
14. Apollonj *et al* (1975) Immunol. Commum., **4**(5): 453-463.

Glossaire des symboles

	A utiliser avant/Date de péremption (An-Mois-Jour)
LOT	Numéro de lot
REF	Numéro de catalogue
⚠	Attention, voir le mode d'emploi
	Fabricant
▽	Suffisant pour "n" tests
IVD	Dispositif de diagnostic *in vitro*
	Limite de température/A conserver entre
	Se référer au mode d'emploi avant de procéder

T-SPOT et le logo d'Oxford Immunotec sont des marques déposées d'Oxford Immunotec Limited
AIM-V, RPMI et GIBCO sont des marques déposées d'Invitrogen
CPT et Vacutainer sont des marques déposées de Becton Dickinson
Ficoll-Paque est une marque déposée de GE Health Technologies
Tween est une marque déposée de ICI Americas

T-SPOT.*TB* est protégé par les brevets et les brevets en instance suivants :
EP 0941478, US 09/308,725, AU 728357, CA 2272881, JP 524410/98, EP 1152012, AU 765013, EP1144447, US 09/830,839, JP 2000-579635, US 09/916,201, WO 02/054072, WO 9709428, US 6290969, US 6338852, US 09/724,685, AU 727602, BR 9610262, CA 2230885, CN 1200147, CZ 9800628, HU 9900902, IL 123506, NO 9800883, PL 325373, TR 9800411, ZA 9607394, WO 9709429, AU 9671587, JP 11514217, BR 9610268, CA 2230927, CN 1200146, WO 9501441, US 5955077, EP 706571, AU 682879, CA 2165949, NZ267984

T-SPOT.*TB* intègre une technologie brevetée accordée sous licence par le Statens Serum Institut, Copenhague, Danemark et Isis Innovation Limited, Oxford, RU.

T-SPOT.*TB* est commercialisé avec l'autorisation du Public Health Research Institute et ne peut être exclusivement utilisé selon les droits de brevet du PHRI qu'à des fins de diagnostic *in vitro* chez l'humain.

© Oxford Immunotec Limited, 2007. Tous droits réservés.

Fabricant
Oxford Immunotec Ltd
94C Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4RY, RU
www.oxfordimmunotec.com